

## PENGEMBANGAN ANTIBODI MONOKLONAL TERHADAP ANTIGEN SPESIFIK *Mycobacterium tuberculosis* SEBAGAI KANDIDAT DIAGNOSIS TUBERKULOSIS MELALUI SPUTUM

Netti Suharti\*, Andani Eka Putra

\*Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas

### ABSTRAK

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit infeksi yang umumnya mengenai jaringan paru yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis complex*. Diperkirakan dua pertiga penduduk dunia sudah terinfeksi oleh mikroorganisme ini dengan penderita berjumlah 17.1 juta orang. Diagnosis dini merupakan kunci utama dalam pengendalian TB. Pengembangan teknik sero-imunologis melalui pengembangan antibodi monoklonal untuk mendeteksi antigen spesifik dalam sputum diperkirakan akan memberikan hasil yang baik.

Penelitian tahun pertama bertujuan untuk mengisolasi protein kultur filtrat *M. Tuberculosis* dan isolasi klon sel Hibridoma penghasil antibodi.

Penelitian dilakukan dengan mengkultur bakteri *M. Tuberculosis* dalam medium cair Middlebrook 7H9 dan mengisolasi protein tersekresi di dalam nya dengan teknik sentrifugasi dan filtrasi. Protein yang didapat diimunisasikan pada mencit Balb/C untuk menginduksi aktivitas sel limfosit. Sel limfosit selanjutnya difusikan dengan sel mieloma sehingga terbentuk sel hibridoma. Dilakukan identifikasi sel hibridoma producer yang mempunyai kemampuan menghasilkan antibodi.

Pada penelitian ini berhasil didapatkan protein kultur filtrat yang terdiri dari banyak fragmen protein dan diketahui bahwa imunisasi secara intraperitoneal memberikan respon imunologis yang lebih baik. Hasil fusi sel mieloma dan sel limfosit berhasil dilakukan dan didapatkan sel *hibridoma producer*.

**Kata kunci:** *M. tuberculosis*, kultur filtrat protein, hibridoma producer, antibodi

### PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit infeksi yang umumnya mengenai jaringan paru yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis complex*. Diperkirakan dua pertiga penduduk dunia sudah terinfeksi oleh mikroorganisme ini dengan penderita berjumlah 17.1 juta orang. Kasus baru ditemukan sekitar 8.8 juta kasus setiap tahunnya dengan angka kematian sekitar 1.7 juta orang (WHO, 2005).

Diagnosis dini merupakan kunci utama dalam pengendalian TB. Pemeriksaan Basil Tahan Asam (BTA) merupakan metoda diagnosis yang paling banyak digunakan, namun sensitivitas hanya 40 – 60%, sebaliknya kultur merupakan metoda diagnosis pasti, namun membutuhkan waktu

lama (van Deun dan Portaels., 1998; Frida et al., 2006).

Metoda diagnosis yang paling menarik saat ini adalah deteksi antigen tersekresi, seperti ESAT-6, CF-10 dan 16-kDa kristalin. Bouda *et al* (2000) memperlihatkan deteksi *Lipoarabinoman* (LAM) dalam sputum merupakan metoda diagnosis yang sensitif namun tidak spesifik. Fenomena ini memberikan harapan bahwa deteksi antigen spesifik ESAT-6 atau CF-10 *M. tuberculosis* akan memberikan hasil diagnosis yang lebih spesifik dan sensitif. Hal itu disebabkan antigen ini hanya dimiliki oleh *M. tuberculosis complex*, tidak ditemukan pada *M. atipik* atau *M. bovis* strain BCG dan yang paling penting disekresikan ke lingkungan. Pengembangan suatu antibodi

monoklonal diharapkan akan dapat mengidentifikasi protein tersekresi tersebut (Bouda *et al.*, 2000; Erns *et al.*, 2007; Brodin *et al.*, 2006).

Pada penelitian ini dicoba dikembangkan antibodi monoklonal spesifik terhadap protein *M. tuberculosis*. Sejauh

mana kemampuan diagnostik antibodi monoklonal ini akan dianalisis dengan menggunakan kultur bakteri sebagai standar baku emas dan dibandingkan apakah kemampuan diagnostik antibodi monoklonal ini dengan metoda lain, seperti Elispot, Quantiferron dan deteksi antibodi.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan eksperimental murni dan ditujukan untuk mendapatkan antibodi monoklonal spesifik terhadap protein kultur filtrat *M. tuberculosis*.

### Kultur *M. tuberculosis* pada medium Lowenstein Jensen

Isolat *M. tuberculosis* didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi FK. Unand, kultur dilakukan dengan menggunakan medium Lowenstein Jensen. Pengamatan dilakukan selama 4 – 8 minggu. Identifikasi *M. tuberculosis* didasarkan pada lama pertumbuhan, morfologi koloni dan reaksi biokimia

### Preparasi Kultur Filtrat Protein (CFP)

Koloni *M. tuberculosis* dimasukkan ke dalam medium Middlebrook cair dan diinkubasi. 2-3 minggu dalam shaker inkubator. Setelah diinkubasi dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan protein dengan bakteri. Sentrifugasi pada 5000 RPM selama 30 menit. Supernatan dipisahkan dari pelet dan difiltrasi dengan durapore 0.22  $\mu$ , sehingga didapatkan protein yang terbebas dari bakteri. Konsentrasi protein diperiksa dengan metoda Bradford dan dibaca pada ELISA dengan panjang gelombang 595 nm. Protein yang didapat diliofilisasi untuk mendapatkan konsentrasi yang lebih tinggi.

### Standar mutu protein

Protein harus bebas dari kontaminasi, sehingga dilakukan pemeriksaan kontaminasi dengan menggunakan agar darah. Suspensi protein yang telah terkontaminasi tidak dipergunakan.

### Pembuatan antibodi monoklonal

Ini merupakan tahapan penelitian yang terpanjang. Tahapan diawali dengan imunisasi pada mencit dengan antigen spesifik *M. Tuberculosis*, yaitu protein ESAT-6. Setelah didapatkan periode dengan respon antibodi yang tertinggi, dilakukan isolasi limfosit dari limfa mencit, dihitung dengan jumlah  $10^8$  sel. Sel mieloma dipilih dengan jumlah yang sama limfosit, dilakukan fusi sehingga didapatkan sel hibridoma. Selanjutnya dilakukan seleksi hibridoma untuk memisahkan hibridoma dengan sel mieloma dan limfosit yang tidak berfusi. Prosedur ini dilakukan dengan media seleksi hipoxantin, aminopterin dan timidin (HAT), dalam hal ini sel hibridoma dan limfosit yang tidak berfusi akan mati. Selanjutnya ditambahkan feeder cells, dalam hal ini makrofag untuk mamfagosit sel-sel yang mati.

Dilakukan prosedur kloning untuk mendapatkan satu klon hibridoma penghasil antibodi. Prosedur ini dilakukan dengan menempatkan 1 sel hibridoma dalam tiap sumuran. Identifikasi hibridoma penghasil antibodi monoklonal (producer) dan bukan penghasil, dilakukan analisis supernatan dari tiap sumuran dengan menggunakan ELISA. Kelompok non produser selanjutnya dibuang. Sehingga pada akhirnya didapatkan sumuran dengan hibridoma produser.

Tahapan berikutnya adalah propagasi hibridoma produser yang dilakukan secara in vivo, yaitu dengan menyuntikkan klon hibridoma pada mencit secara intraperitoneal. Dalam 2 minggu, mencit akan mengalami ascites yang mengandung banyak antibodi monoklonal.



Antibodi monoklonal yang dihasilkan dipresipitasi dengan amonium sulfat jenuh dan dipurifikasi dengan teknik afinitas kromatografi. Pada akhir tahapan ini didapatkan suatu antibodi monoklonal dan klon sel hibridoma produser.

#### Implikasi etik pada hewan

Persyaratan etik pada hewan coba didasarkan pada protokol penggunaan hewan coba untuk penelitian yang dikeluarkan oleh komisi etik penelitian Universitas Andalas.

#### HASIL

Penelitian pada tahap pertama ditujukan untuk mendapatkan protein kultur filtrat dan mengisolasi klon hibridoma penghasil antibodi. Karakteristik antibodi dan uji diagnostik baru dilakukan pada tahun kedua sesuai yang direncanakan dalam proposal penelitian. Klon hibridoma yang telah diisolasi dapat disimpan dalam jangka panjang dalam tabung nitrogen.

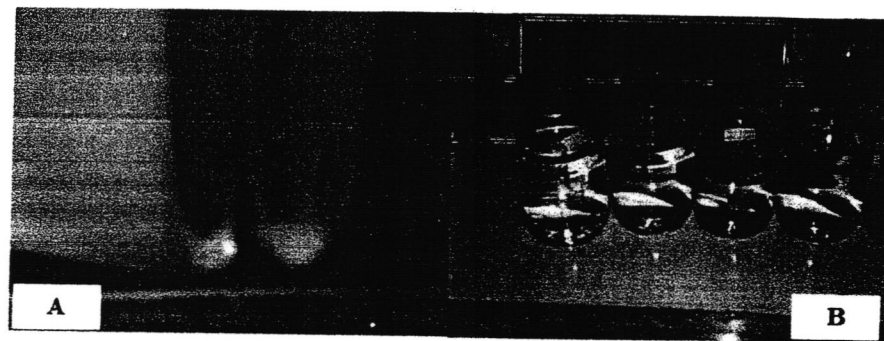
#### Preparasi protein Kultur Filtrat *M. tuberculosis*

Protein kultur filtrat merupakan protein yang disekresikan oleh bakteri *M. tuberculosis* ke dalam lingkungan dan terdiri dari banyak protein antara lain esat-6, cfp-10, 18 kDa, 38 kDa dan lain sebagainya.

Identifikasi detail protein tidak dilakukan dalam tahapan ini karena akan dilakukan pada saat penilaian karakteristik antibodi.

Bakteri *M. tuberculosis* ditumbuhkan pada medium cair Middlebrook 7H9 selama 15 hari tanpa ditambah dengan suplemen OADC, namun diberikan antibiotika PANTA (Becton Dickinson) untuk mencegah kontaminasi. PANTA mengandung sejumlah antibiotika dan anti jamur, antara lain amfoterisin, Nalidixid acid, trimethoprim dan vancomisin. Pada penelitian ini digunakan 2 (dua) isolat bakteri, yaitu isolat *M. tuberculosis* strain H37Rv yang didapat dari bagian Mikrobiologi FK. UGM dan isolat lokal yang didapat dari RS. Dr. Sardjito. Isolat lokal telah diidentifikasi sebagai *M. tuberculosis* dengan menggunakan sejumlah reaksi biokimia, seperti Niasin, Para Nitro Benzoic Acid, katalase dan Nitrat (gambar 1).

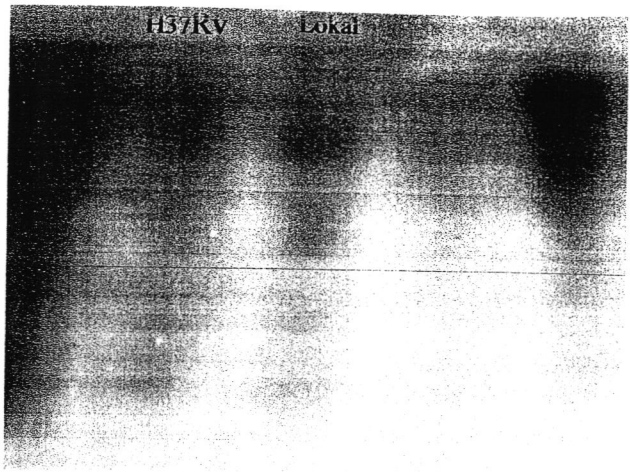
Untuk menjamin bahwa protein yang didapat benar-benar berasal dari *M. tuberculosis* dilakukan identifikasi kemungkinan kontaminasi dengan agar darah. Hasil pemeriksaan tidak ada pertumbuhan bakteri lain, yang memperlihatkan bahwa suspensi bakteri benar-benar berasal dari *M. tuberculosis*.



Gambar 1. Kultur *M. tuberculosis* dalam medium padat Lowenstein Jensen dan medium cair Middlebrook 7H9

Protein yang terdapat dalam suspensi dipisahkan dari bakteri dengan sentrifugasi pada 5000 RPM selama 15 menit dan filtrasi dengan durapore 0.22. Protein yang diperoleh

dielektroforesis dengan SDS-PAGE. Visualisasi elektroforesis memperlihatkan pola pita yang terpisah – pisah (gambar 2).



Gambar 2. Hasil elektroforesis protein dari isolat *M. tuberculosis* H37Rv dan lokal. Band terlihat tipis karena konsentrasi protein yang sangat rendah.

Pada penelitian ini, konsentrasi protein terlihat sangat rendah saat dinilai dengan metoda Bradford (tabel 1). Fenomena ini memperlihatkan sedikitnya jumlah protein yang disekresikan oleh bakteri *M. tuberculosis*. Penelitian ini tidak dapat menjelaskan penyebab rendahnya produksi protein tersekresi oleh *M. tuberculosis*.

Tabel 1. Konsentrasi protein dari isolat *M. tuberculosis* strain H37Rv dan lokal

No	Isolat	Konsentrasi (ug/ml)
1	H37Rv 1	7
2	H37Rv 2	4,9
3	Lokal 1	28
4	Lokal 2	17,85

Hasil ini memperlihatkan gambaran yang sesuai dengan yang ditemukan oleh penelitian lain, dimana semakin virulen suatu bakteri *M. tuberculosis*, maka variasi protein yang diproduksi akan semakin banyak. Hal itu disebabkan sebagian besar protein yang dihasilkan menentukan viabilitas dan virulensi bakteri itu sendiri.

**Pengembangan sel hibridoma penghasil (hibridoma producer)**  
**Imunisasi**

Imunisasi mencit Balb/C menggunakan protein kultur filtrat dengan

konsentrasi 5 ug/ml sebanyak 100 ul. Agar memberikan respon imun yang lebih baik diberikan *freud adjuvan complet dan incomplet* dalam volume yang sama dengan protein kultur filtrat. Imunisasi diberikan dalam 3 (tiga) tahapan dengan interval 12 hari, yang diawali dengan complet dilanjutkan dengan 2 kali tahapan incomplet. Pada penelitian ini digunakan 2 (dua) model imunisasi, yaitu intraperitoneal dan subkutan. Protein yang digunakan juga 2 (dua) jenis, yaitu yang berasal dari strain H37Rv dan isolat lokal. OD antibodi yang terbentuk dibandingkan dengan kontrol (tabel 2).



Tabel 2. Nilai Optical density (OD) IgG terhadap protein kultur filtrat

No	Isolat	Nilai OD
1	Mencit 1 dengan protein H37Rv subcutan	0.236
2	mencit 2 dengan protein H37Rv subkutan	0.357
3	Mencit 3 dengan protein H37Rv subkutan	0.382
4	Mencit 4 dengan protein H37Rv subkutan	0.344
5	Mencit 5 dengan protein H37Rv intraperitoneal	0.421
6	Mencit 6 dengan protein H37Rv intraperitoneal	0.389
7	Mencit 7 dengan protein H37Rv intraperitoneal	0.453
8	Mencit 8 dengan protein H37Rv intraperitoneal	0.552
9	Mencit 1 dengan protein lokal subcutan	0.435
10	mencit 2 dengan protein lokal subkutan	0.561
11	Mencit 3 dengan protein lokal subkutan	0.415
12	Mencit 4 dengan protein lokal subkutan	0.329
13	Mencit 5 dengan protein lokal intraperitoneal	0.547
14	Mencit 6 dengan protein lokal intraperitoneal	0.681
15	Mencit 7 dengan protein lokal intraperitoneal	0.778
16	Mencit 8 dengan protein lokal intraperitoneal	0.649

Berdasarkan data ini terlihat bahwa mencit nomor 7 yang mendapat imunisasi dengan protein lokal secara intraperitoneal memperlihatkan nilai OD IgG anti protein lokal yang lebih tinggi dari yang lain. Hal ini menyebabkan mencit ini dijadikan sebagai objek untuk isolasi limfosit.

#### Fusi limfosit dengan sel Mieloma

Fusi sel limfosit dan sel mieloma dilakukan secara *in vitro* dengan bantuan fusogen yaitu Poli Etilen Glikol (PEG) dengan konsentrasi 45%, dengan pH 8.0 – 8.2. Keadan ini dianggap optimal untuk fusi sel (Soeyoko, 1992). Untuk mencegah kontaminasi ditambahkan antibiotika dan anti jamur, yaitu penisilin 100 ug/ml, streptomisin 100 ug/ml dan Fungizon 2%. Pada fusi ini juga ditambahkan makrofag sebagai feeder cells yang berperan dalam memfagosit semua sel-sel mati dan bahan sisa.

Sel mieloma bersifat immortal sedangkan limfosit mortal, sehingga pada prosedur fusi, sel sel mieloma dan limfosit yang tidak berfusi harus dibuang. Pada penelitian ini digunakan HAT yang bersifat toksik terhadap sel mieloma sedangkan sel limfosit akan mati dengan sendirinya. Pada akhirnya dalam medium fusi akan ditemukan hanya sel hibridoma.

Sel hibridoma terdiri dari hibridoma producer yaitu sel yang mempunyai kemampuan menghasilkan antibodi dan non producer, yang tidak mempunyai kemampuan menghasilkan antibodi. Identifikasi sel ini ditentukan dari ada tidaknya anti IgG yang terbentuk pada kultur sel tersebut. Pada penelitian ini ditemukan klon hibridoma producer terdapat pada sumuran nomor A3.

#### KESIMPULAN

Pada penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Telah dapat dilakukan purifikasi sederhana protein kultur filtrat dari

bakteri *M. tuberculosis* H37Rv dan isolat lokal

2. Telah dapat diidentifikasi klon sel hibridoma producer